

明 細 書

組織の維持および／または修復に関連する骨髄関連細胞

技術分野

[0001] 本発明は、遺伝子を組み込んだベクターが導入された、組織の維持および／または修復に関連する形質転換骨髄関連細胞、および該細胞の利用に関する。

背景技術

[0002] 従来の医療は、疾患部位である障害を受けた臓器や組織を早期に発見し、疾患の病因を突き止めるとともに、早期のうちに障害部位を切除することを治療目的とするものが主流であった。こうした治療は、切除後に残存する臓器または組織の自然治癒（または回復）能力に依存することが大きかった。しかしながら、このような治療を施す場合であっても、切除量が一定限度を超えてしまえば、臓器または組織本来の機能が回復することは困難となる。こうした患者に対しては、臓器や組織を再生するような治療を施すか、あるいは生体外から移植によって補足する必要がある。

[0003] 最近、再生医療を目指す基礎研究が進み、幹細胞を用いた中枢神経機能の再生、筋ジストロフィー、パーキンソン病等の重篤な疾患の治療への期待が高まってきた。再生医療の基盤となる幹細胞は、分化の過程において階層的であり、より未分化な幹細胞は自己複製能が高い。骨髄細胞に含まれる骨髄幹細胞はより未分化な細胞であり、多分化能を有し、胚葉を越えて分化可能であることが報告されている（Jiangら、2002）。また、骨髄細胞を用いた骨・軟骨再生、皮膚再生などの組織工学の分野においては、すでに臨床応用されている（黒柳、2003）。一方、再生医療においては、非自己の細胞だけでなく、自己の細胞を使用する研究も進み、自己の骨髄細胞をドナーソースとして、血管内皮細胞、心筋細胞、神経細胞、肝細胞へと分化誘導させ、これらを用いて細胞療法を行う戦略が考案されている（高橋、2002）。

[0004] 一方、臓器および組織は実質細胞のみで構成されているわけではなく、これらは、細胞が接着する足場となる細胞外マトリックスや非実質系（または間葉系）細胞などの複数の構成因子によって構築されている。したがって、単に、疾患の原因となる標的細胞を除去または治癒することを目的とする治療法によっては、本来の大きさおよび

機能を有する臓器および組織まで修復させることは困難である。

- [0005] 最近、骨髄移植後の患者では複数の臓器および組織において、移植骨髄細胞由来の細胞が存在することが明らかになり、骨髄細胞が組織回復に何らかの作用をしている可能性が示唆されている(Krauseら、2001)。また、生体外で遺伝子導入した間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cell:MSC)を生体にもどすことによって癌の治療効果を高めることも報告されている(Ohlssonら、2003)。このように骨髄幹細胞や間葉系幹細胞は、臓器および組織の再生・回復において極めて重要な役割を果たしているといえる。

非特許文献1:Jiang, Y. et al., Nature, 418, 41-49(2002)

非特許文献2:黒柳能光、日本再生医療学会雑誌「再生医療」、Vol. 2、No. 3、39-45(2003)

非特許文献3:高橋淳、日本再生医療学会雑誌「再生医療」、Vol. 2、No. 2、67-74(2002)

非特許文献4:Krause, D. S. et al., Cell, 105, 369-377(2001)

非特許文献5:Ohlsson, L. B. et al., Exp. Mol. Pathol., 75, 248-255(2003)

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0006] 本発明の目的は、遺伝子を組み込んだベクターが導入された形質転換骨髄関連細胞であって、組織の維持および／または修復に関連する形質転換骨髄関連細胞を提供することである。また、本発明の目的は、哺乳動物から取り出された骨髄関連細胞に、遺伝子を組み込んだベクターを用いて該遺伝子を導入することを含む、形質転換骨髄関連細胞の調製方法を提供することである。

- [0007] 本願発明において、遺伝子を組み込んだベクターが導入された形質転換骨髄関連細胞を調製し、該細胞を利用することにより、生体の組織の維持および修復に関連する疾患の診断・治療が可能になる。

課題を解決するための手段

- [0008] 前述したように、骨髄幹細胞や間葉系細胞は再生医療において重要な役割を果た

すと考えられている。従来、生体内で癌化した特定の細胞を死滅させることを目的として、特定の遺伝子を導入した間葉系細胞を生体内に投与するという治療は行われていた。しかしながら、標的となる細胞を直接死滅させるための治療とは異なり、臓器や組織が本来有する自然治癒力を発揮させることによって疾患を治療する方法は知られていなかった。そこで、本発明者らは、組織の維持および／または修復を目指した疾患の診断・治療を目的として、特定の遺伝子を導入した形質転換骨髄関連細胞を調製することを目指した。具体的には、本発明者らは、骨髄関連細胞に予め組織の維持または修復に関連する遺伝子を組み込んだベクターを導入し、疾患モデルの実験動物に形質転換した骨髄関連細胞を投与することによって、疾患組織の機能を回復させることに成功し、本発明を完成するに至った。したがって、本発明は、遺伝子を組み込んだベクターが導入された形質転換骨髄関連細胞を提供することにより、再生医療の分野における該細胞の多様な必要性を満たすのを援助する。

[0009] すなわち、本発明によれば、遺伝子を組み込んだベクターが導入された形質転換骨髄関連細胞であって、組織の維持および／または修復に関連する前記形質転換骨髄関連細胞が提供される。より具体的には、本発明は以下の発明に関する。

[1] 遺伝子を組み込んだベクターが導入された形質転換骨髄関連細胞であって、組織の維持および／または修復に関連する前記形質転換骨髄関連細胞。

[2] 前記遺伝子が、組織の維持および／または修復に直接関与する、又は形質転換された骨髄関連細胞による組織の維持および／または修復する機能を補助する機能を有する遺伝子であるか、あるいは、マーカー遺伝子である、[1]に記載の形質転換骨髄関連細胞。

[3] 組織の維持および／または修復に直接関与する、又は形質転換された骨髄関連細胞による組織の維持および／または修復する機能を補助する機能を有する遺伝子が、HGF、FGF、VEGF、PDGF、インターロイキン、GCSF、MCSF、SCF、IFN、Crx、およびOtx2からなる群から選択される細胞の分化・増殖制御活性または細胞の機能制御活性を有するタンパク質若しくはペプチドをコードする遺伝子である、[2]に記載の形質転換骨髄関連細胞。

[4] 前記ベクターが、アデノウイルスベクターまたはセンダイウイルスベクターである、

- [1]ないし[3]のいずれか1項に記載の形質転換骨髄関連細胞。
- [5]アデノウイルスベクターがHGF遺伝子を搭載したアデノウイルスベクターである、
[4]に記載の形質転換骨髄関連細胞。
- [6]センダイウイルスベクターがFGF2遺伝子を搭載したセンダイウイルスベクターである、[4]に記載の形質転換骨髄関連細胞。
- [7]センダイウイルスベクターがIFN遺伝子を搭載したセンダイウイルスベクターである、[4]に記載の形質転換骨髄関連細胞。
- [8]骨髄関連細胞が、骨髄細胞、骨髄由来細胞である、[1]ないし[7]のいずれか1項に記載の形質転換骨髄関連細胞。
- [9]前記組織が疾患組織である、[1]ないし[8]のいずれか1項に記載の形質転換骨髄関連細胞。
- [10]疾患が肝疾患である、[9]に記載の形質転換骨髄関連細胞。
- [11]肝逸脱酵素値を下げる、[10]に記載の形質転換骨髄関連細胞。
- [12]疾患が癌である、[9]に記載の形質転換骨髄関連細胞。
- [13]癌が肝癌である、[12]に記載の形質転換骨髄関連細胞。
- [14]末梢血管に投与するための、[1]ないし[13]のいずれか1項に記載の形質転換骨髄関連細胞。
- [15]哺乳動物から取り出された骨髄関連細胞に、遺伝子を組み込んだベクターを用いて該遺伝子を導入することを含む、形質転換骨髄関連細胞の調製方法。
- [16]形質転換骨髄関連細胞を調製するための、遺伝子を担持する組換えベクターの使用。
- [17][1]から[14]のいずれかに記載の形質転換骨髄関連細胞を含む、組織の維持および／または修復のための医薬。
- [18][10]に記載の形質転換骨髄関連細胞を含む肝疾患治療薬。
- [19]肝疾患が肝障害、肝不全、肝硬変、または肝炎である、[18]に記載の肝疾患治療薬。
- [20]肝疾患が肝癌である、[18]に記載の肝疾患治療薬。
- [21]遺伝子がHGFまたはFGF2である、[18]または[19]に記載の肝疾患治療薬

。

[22] 遺伝子がIFNである、[18]または[20]に記載の肝疾患治療薬。

[23] ベクターが、アデノウイルスベクターまたはマイナス鎖RNAウイルスベクターである、[18]から[22]のいずれかに記載の肝疾患治療薬。

[24] ベクターがF遺伝子を欠損するマイナス鎖RNAウイルスベクターである、[23]に記載の肝疾患治療薬。

[25] [10]に記載の形質転換骨髄関連細胞および薬学的に許容される媒体を含む組成物を調製する工程を含む、肝疾患治療薬の製造方法。

[26] 肝疾患が肝障害、肝不全、肝硬変、または肝炎である、[25]に記載の方法。

[27] 肝疾患が肝癌である、[25]に記載の方法。

[28] 遺伝子がHGFまたはFGF2である、[25]または[26]に記載の方法。

[29] 遺伝子がIFNである、[25]または[27]に記載の方法。

[30] ベクターが、アデノウイルスベクターまたはマイナス鎖RNAウイルスベクターである、[25]から[29]のいずれかに記載の方法。

[31] ベクターがF遺伝子を欠損するマイナス鎖RNAウイルスベクターである、[30]に記載の方法。

[0010] 本発明の形質転換骨髄関連細胞に導入される遺伝子は、組織の維持および／または修復に直接関与する、又は形質転換された骨髄関連細胞による組織の維持および／または修復する機能を補助する機能を有する遺伝子であるか、あるいは、マーカー遺伝子を含む。本発明の形質転換骨髄関連細胞は、組織の維持および／または修復を促進する医薬として使用できる。

[0011] 本発明の形質転換骨髄関連細胞に導入される遺伝子を組み込むベクターは、一般的に、ヒト、マウス等の哺乳動物由来の細胞において遺伝子発現を可能にするものであれば特に限定されない。好ましくは、ウイルスベクター、特に組換えアデノウイルスベクターまたは、センダイウイルスベクターなどのマイナス鎖RNAウイルスベクターである。前記遺伝子を組み込んだベクターの好ましい態様は、HGF遺伝子、FGF-2遺伝子、またはIFN β 遺伝子を担持したアデノウイルスベクターまたはセンダイウイルスベクターが挙げられる。前記遺伝子を組み込んだベクターの特に好ましい態

様は、HGF遺伝子を担持したアデノウイルスベクター(adexHGF)、FGF-2を担持しF遺伝子を欠失させたセンダイウイルスベクター(FGF2-SeV/ Δ F)、IFN β 遺伝子を担持しF遺伝子を欠失させたセンダイウイルスベクター(IFN β -SeV/ Δ F)、より好ましくはadexHGF、FGF2-SeV/ Δ F、IFN β -SeV/ Δ Fである。本発明の一態様において、ヒト用の組換えセンダイウイルスベクターとしては、hFGF2-SeV/ Δ F、IFN β -SeV/ Δ Fが使用できる。

[0012] 本発明に使用される骨髄関連細胞は、骨髄細胞、骨髄由来細胞を含む。

本発明の形質転換骨髄関連細胞によって維持および／または修復される組織は、典型的には、疾患組織である。また、組織本来の機能を維持させることを目的とする場合においては、疾患組織に限定されない。疾患組織には、炎症性疾患、肝疾患、免疫性疾患、癌疾患、遺伝子疾患が例示される。好ましくは、炎症性疾患、肝疾患、癌疾患、より好ましくは、炎症性疾患、肝疾患である。すなわち、本発明の形質転換骨髄関連細胞は、炎症性疾患、肝疾患、免疫性疾患、癌疾患、遺伝子疾患等における疾患治療剤として使用できる。より好ましくは、本発明の形質転換骨髄関連細胞は、肝疾患治療剤として使用できる。細胞は、適宜薬学的に許容される媒体と共に医薬組成物とすることができる。本発明は、遺伝子を担持するベクターを骨髄関連細胞に導入する工程を含む、上記の疾患治療剤の製造方法、および上記の疾患治療剤の製造における、上記ベクターまたは形質転換骨髄関連細胞の使用にも関する。遺伝子は、好ましくはHGF、FGF2、またはIFN β である。

[0013] 本発明の一態様において、本発明の形質転換骨髄関連細胞の使用により、肝逸脱酵素値を下げることができる。すなわち本発明の形質転換骨髄関連細胞は、肝逸脱酵素値の降下剤として使用できる。また本発明は、遺伝子を担持するベクターを骨髄関連細胞に導入する工程を含む、肝逸脱酵素値降下剤の製造方法、および肝逸脱酵素値降下剤の製造における、上記ベクターまたは形質転換骨髄関連細胞の使用にも関する。遺伝子は、好ましくはHGFまたはFGF2が用いられる。

また本発明の一態様において、本発明の形質転換骨髄関連細胞の使用により、肝癌などの癌の増殖を抑制することができる。すなわち本発明の形質転換骨髄関連細胞は、肝癌などの癌に対する治療剤として使用できる。また本発明は、遺伝子を担持

するベクターを骨髓関連細胞に導入する工程を含む、癌治療剤(または癌細胞増殖抑制剤)の製造方法、および癌治療剤(または癌細胞増殖抑制剤)の製造における、上記ベクターまたは形質転換骨髓関連細胞の使用にも関する。遺伝子は、好ましくはIFN、特にIFN β が用いられる。

[0014] 本発明の形質転換骨髓関連細胞は、これらに限定されないが、末梢血管内、皮下、筋肉内、腹腔内、気道内、脳室内、髄腔内、胸腔内に投与することができる。好ましくは、末梢血管内、皮下への投与、より好ましくは、末梢血管内への投与である。

[0015] 本発明によれば、本発明の形質転換骨髓関連細胞を調製する方法が提供される。本発明の方法は、典型的には、哺乳動物から骨髓関連細胞を取り出し、遺伝子を組み込んだベクターを用いて該遺伝子を導入することを含む。

[0016] 本発明によれば、形質転換骨髓関連細胞を調製するための、遺伝子を担持する組換えベクターの使用法が提供される。

発明を実施するための最良の形態

[0017] 以下、本発明の説明のために、好ましい実施形態に関して詳述する。

(1) 骨髓関連細胞

本発明の形質転換骨髓関連細胞に使用する骨髓関連細胞には、骨髓細胞、骨髓由来細胞、あるいはその他の造血幹細胞および血液中の細胞成分が含まれる。好ましくは、骨髓細胞、骨髓由来細胞である。骨髓細胞は、骨髓を構成する細胞であって、造血に関与する前駆細胞の集団である。これにより、骨髓細胞には、造血幹細胞を多く含み、造血幹細胞としては、CD34陽性細胞が例示される。分化の最終段階である赤血球は、造血幹細胞から分化した原赤芽球、前赤芽球、多染性赤芽球、正常赤芽球を経て形成したものである。また、白血球は、顆粒の染色性により好中性白血球、好エオシン性白血球、好塩基性白血球、リンパ球、単球などに分類される。特に、リンパ球は、骨髓で成熟する細胞と胸腺で成熟する細胞があり、胸腺で成熟するのはT細胞と考えられ、一方、骨髓で成熟するのはB細胞と考えられている。

[0018] 本明細書において、「骨髓細胞」というときは、上記の通り、骨髓を構成する細胞のうち造血系に関与する前駆細胞群を示すものとし、特定の細胞に限定しない。また、前記造血幹細胞は、通常、骨髓に多く存在するが、化学療法後の骨髓造血の回復

期やG-CSF(顆粒球コロニー刺激因子)使用後には、末梢血中にも現れることが知られ、このような造血幹細胞を特に末梢血幹細胞と称する。本発明の一態様において、骨髓関連細胞には、末梢血幹細胞も含まれる。また、臍帯血中にも造血幹細胞が存在することが知られており、臍帯血中の造血幹細胞も骨髓関連細胞に含まれる。末梢血造血幹細胞、臍帯血造血幹細胞、および骨髓細胞などの造血細胞を、本発明において好適に用いることができる。

[0019] 本明細書において、「骨髓由来細胞」は、骨髓に由来する抗体産生細胞の前駆細胞であるB細胞を含む。B細胞は、胎生期では肝臓で、生後では骨髓で幹細胞より分化する細胞であるが、分化過程でIg遺伝子座の活性化、リコンビナーゼ遺伝子産物発現に伴いIgH鎖の再編成が誘導され、 μ 鎖が発現する。この時期の細胞をプレB細胞と呼ぶ。プレB細胞における μ 鎖発現は続いて誘導されるB細胞成熟に重要な役割を果たすと考えられている。さらに、L鎖再編成が誘導されたB細胞は、抗原刺激により抗体産生細胞へと分化する。また、B細胞以外の血液中の各種細胞成分、例えば、血小板、赤血球、顆粒球、T細胞なども含まれる。

[0020] また、骨髓関連細胞を得るには、骨髓または他の造血源中の他の細胞から多能性の幹細胞を単離することが必要である。骨髓細胞は、骨髓源、例えば腸骨稜、脛骨、大腿骨、脊椎または他の骨腔から得ることができる。造血幹細胞の他の入手源は、胚卵黄包、胎児肝臓、胎児および成人の脾臓、成人末梢血液および臍帯血をはじめとする血液などが含まれる。胎児骨または他の骨源からの骨髓の単離に際しては、骨から洗い出すのに適当な平衡塩溶液を用いることができ、一般には、約5-25mMの低濃度の許容し得る緩衝液と一緒にしたウシ胎児血清若しくは他の天然性因子を補った平衡塩溶液を用いることができる。好ましくは、緩衝液は、Hepes、リン酸緩衝液、乳酸緩衝液である。他の方法としては、常法に従って、骨から骨髓を吸引することができる。例えば、マウスの大腿骨や脛骨由来の骨髓細胞の採取については、Terai, S., et al., J. Biochem. 134, 551-558(2003)に記載の方法に従って行うことができる。

[0021] 骨髓由来細胞を得るには、前記方法で得られる骨髓から、骨髓由来細胞の膜表面に提示された抗原を指標として分離することができる。このような骨髓由来細胞を分

離する装置としては、FACS(ベクトンディッキンソン)が例示される。また、細胞表面に提示された抗原に対する分子を磁気ビーズ等に吸着させ、骨髓由来細胞を分離することもできる。

[0022] 本発明において使用される骨髓関連細胞には、具体的には、脊椎動物、好ましくは哺乳動物由来の細胞、例えば、ヒト由来、マウス由来、アフリカツメガエル由来、ラット由来、ハムスター由来、またはサル由来の細胞若しくはそれらの細胞から樹立した培養細胞株などが含まれる。

[0023] 骨髓関連細胞に含まれる造血幹細胞(HSC)は、顆粒球、単球の前駆細胞をコロニーアッセイ法で算定したり、HSCに特徴的と考えられるCD34(抗原)陽性細胞をフローサイトメーターで測定することにより同定することができる。具体的には、造血幹細胞としては、lineage negative(lin^-)の細胞であって、 CD34^+ 、 CD38^- (Bhatia, M. ら, Proc Natl Acad Sci USA, 1997;94:5320-5325)の表現型を有する細胞が挙げられる。 lin^- (lineage negative)の表現型は、適宜市販のキット等を用いて同定および選択することができるが、例えばGPA、CD3、CD2、CD56、CD24、CD19、CD14、CD16、およびCD99bが全てnegativeのものである。

[0024] ヒト造血幹細胞の分離方法は、以下の文献も参照することができる(Leary, AG., Blood 69:953, 1987;Sutherland HJ, Blood 74:1563, 1989;Andrews RG, J Exp Med 169:1721, 1989;Terstappen LWMM, Blood 77:1218, 1991;Lansdorp PM, J Exp Med 175:1501, 1992;Briddell RA, Blood 79:3159, 1992;Gunji Y, Blood 80:429, 1992;Craig W, J Exp Med 177:1331, 1993;Gunji Y, Blood 82:3283, 1993;Traycoff CN, Exp Hematol 22:215, 1994;Huang S, Blood 83:1515, 1994;DiGinto D, Blood 84:421, 1994;Murray L, Blood 85:368, 1995;Hao QL, Blood 86:3745, 1995;Laver JH, Exp Hematol 23:1515, 1995;Berardi AC, Science 267:104, 1995;Kawashima I, Blood 87:4136, 1996;Lee mhuis T, Exp Hematol 24:1215, 1996;Civin CI, Blood 88:4102, 1996;Larochelle A, Nature Med 2:1329, 1996;Tajima S, J Exp Med 184:1357, 1996;Sakabe H, Stem Cells 15:73, 1997;Sakabe H, Leu

kemia 12:728, 1998;原田実根他編, 新しい造血幹細胞移植, 南江堂, 1998, 9-23ページ)。

- [0025] 骨髓細胞を得る方法をより具体的に例示すれば、例えば、骨髓の正常造血を確認後、全身麻酔下に腸骨および胸骨から採取する。目標細胞数は、骨髓有核細胞 3×10^8 から 5×10^8 /kg程度である。1回に数mlずつ、複数回にわたって採取する。骨組織などの混入がある場合にはメッシュを通した後、バッグにつめる。移植の際には粗いフィルターを用いて輸注する。同種移植の場合は、ヒト白血球抗原(human lymphocyte antigen;HLA)適合ドナーを選択することが好ましい。但し、GVHD予防法の確立、新しい免疫抑制剤の開発、およびCD34陽性細胞の純化技術などにより、HLA不一致のドナーでも移植は可能になってきている。ドナーとしては、HLA-A、-B、および-DRの3組6抗原のうち、4種類以上、より好ましくは5種類以上、より好ましくは全てがレシピエントと一致することが好ましい。
- [0026] 末梢血より末梢血幹細胞を採取する場合は、連日G-CSFを皮下注し、動員された末梢血CD34⁺細胞数のピーク時に採取を行う。一般に、CD34陽性細胞の動員は数日程度持続するので、連日の末梢血幹細胞採取が可能である。末梢血幹細胞(PBSC)の動員および採取については、Harada M. ら, J. Hematother 5:63-71, 1996、Waller CF. ら, Bone Marrow Transplant 18:279-283, 1996、Anderlini P. ら, Blood 90:903-908, 1997、原田実根他編, 新しい造血幹細胞移植, 南江堂, 1998, 67-72ページ、名古屋BMTグループ編, 造血細胞移植マニュアル改訂三版, 2004, 237-240ページも参照のこと。動員に用いるG-CSFとしては、野生型蛋白質の他、N末端を改変した誘導体(nartograstinなど)、糖鎖が付加された修飾蛋白質(lenograstinなど)を用いることができる。またG-CSFと他の造血因子を併用してもよい。例えば、GM-CSF、IL-3、またはSCFなどを併用することができる(Huhn RD. ら, Exp Hematol 24:839-847, 1996;Begley C G. ら, Blood 90:3378-3389, 1997;Lane TA. ら, Blood 85:275-282, 1995)。G-CSF投与中は、腰痛、骨痛および発熱などの全身症状の軽減や、血小板凝集能亢進の防止のため、aspirinを投与することができる。
- [0027] 混入した血小板をそのまま輸注すると塞栓などの原因となる場合があるため、採取

後に除去することが好ましい。例えばダブルバックに集めて弱遠心(200g、15分)するか、遠心管に分注して1600回転、10分遠心して血小板を除去し、RPMI1640培地に交換することができる。採取した細胞を凍結保存する場合は、10%自己血清、10%DMSOを含むRPMI1640培地に浮遊させて凍結させ、programmed freezerで凍結、液体窒素中で保存する。細胞濃度は 2×10^7 から 6×10^7 /mlとすることができる。比較的短期間の細胞保存のためには、細胞浮遊液(1×10^8 /ml以下の濃度)に終濃度6%Hydroxyethyl Starch(HES)、5%DMSO、4%albuminとなるように、氷冷した等量の保存液を混合し、 -80°C のdeep freezerで凍結保存することができる(Knudsen LM.ら, J. Hematother. 5:399-406, 1996)。

- [0028] 臍帯血幹細胞の調製では、臍帯血に赤血球沈降剤(HES)を加え、上層を新しいバッグに回収し、遠心により細胞を分離・濃縮する。回収した細胞は、凍害保護液を加え、programmed freezerで凍結させ保存が可能である。
- [0029] 連続式血液成分分離装置で得られた細胞浮遊液は、顆粒球や赤血球の混入が非常に少ないため、単核球分離操作を省略することができる。顆粒球や赤血球が多く含まれる場合には、Ficoll比重遠心法により単核球を分離することができる。骨髓液の場合は、顆粒球や赤血球の除去と濃縮のため、Ficoll処理または血液分離装置による単核球分離を行うことができる。得られた細胞画分からのCD34陽性細胞の精製純化には、例えばIsolex system(Nexell社)またはCliniMACS(AmCell社)などを用いることができる。
- [0030] なお、単離した骨髓関連細胞は、例えばメチルセスローズ法により、SCF、IL-3、GM-CSF、G-CSF、Epoを添加して培養することもできる(Sonoda, Y. ら, Blood 84:4099-4106, 1994;Kimura T. ら, Blood 90:4767-4778, 1997)。細胞は 1×10^2 から 1×10^4 /ml程度で添加し、例えば 37°C 、5% CO_2 、5% O_2 下で培養する。但し、培養条件は適宜調整してよい。
- [0031] 自家移植に用いるCD34陽性細胞数は、例えば 2×10^6 /kg程度である(Schots R. ら, Bone Marrow Transplant. 17:509-515, 1996;Zimmerman T M. ら, Bone Marrow Transplant. 15:439-444, 1995)。CD34陽性細胞数は、通常の2 color flowcytometryで計測することができる。具体的には、骨髓

細胞や末梢血アフェレーシス細胞を溶血処理により赤血球を除去した後、forward scatterと抗CD45抗体で展開し、gateを決めて赤血球および血小板を除く。次に、このgateをside scatterと抗CD34抗体で展開し、好中球などの非特異反応部分を除いた分画中の細胞数の全細胞数に対する割合で算定する。この値と、予め血球計測機で測定した血球数から、全CD34陽性細胞数が算出できる。

凍結保存した細胞に含まれるviableな幹細胞の数は、コロニー形成法によりCFU-GMを数える方法で知ることができる。移植に必要なCFU-GMの基準は、一般的には 1×10^5 〜 2×10^5 /kgである。

[0032] (2) 本発明の形質転換骨髄関連細胞

本発明の形質転換骨髄関連細胞は、遺伝子を組み込んだベクターが導入され形質転換した骨髄関連細胞である。

[0033] 骨髄関連細胞の形質転換に使用する遺伝子は、組織の維持および／または修復に直接関与する、又は形質転換された骨髄関連細胞による組織の維持および／または修復する機能を補助する機能を有する遺伝子であるか、あるいは、マーカー遺伝子を含む。

[0034] 組織の維持および／または修復に直接関与する、又は形質転換された骨髄関連細胞による組織の維持および／または修復する機能を補助する機能を有する遺伝子は、形質転換された骨髄関連細胞において発現され、当該遺伝子産物が組織の維持および／または修復に直接有用なものでよい。あるいは当該遺伝子産物が、骨髄関連細胞が本来有する組織の維持および／または修復する機能を、直接的若しくは間接的に補助する機能を有するものであってもよい。本発明に使用しうる遺伝子の一態様として、HGF、FGF、VEGF、PDGF、インターロイキン、GCSF、MCSF、SCF、IFN、CrxおよびOtx2からなる群から選択される、細胞の分化・増殖制御活性および様々な機能制御活性を有するタンパク質またはペプチドをコードする遺伝子が含まれる。こうした遺伝子の核酸配列の情報は、遺伝子データベース(例えば、NCBI)から入手可能である。したがって、当業者であれば、入手した遺伝子情報を利用することにより、発現ベクター等に組み込むことが可能である。

[0035] 例えば、肝細胞増殖因子(HGF)であれば、Miyazawaら, Biochem. Biophys.

Res. Comm. 163, 967–973, 1989、Nakamuraら, Nature, 342, 440–443, 1989、Sekiら, Biochem. Biophys. Res. Comm. 172, 321–327, 1990、Tashiroら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 3200–3204, 1990、Okajimaら, Eur. J. Biochem. 193, 375–381, 1990、Nakamuraら, J. Clin. Invest. 106, 1511–1159, 2000などによって報告されている。HGFとしては、天然のポリペプチドに加え、多くのバリエーションが知られている。例えば、特開平5–111383、米国特許第4683195号、同4816567号、同4745055号、同4444878号、欧州特許第256654号、同120694号、同125023号、同255694号、同266663号、国際公開第88/03559号、同88/03565号、同94/06456号に記載のHGFおよびその誘導体を用いる遺伝子を用いることもできる。また、ヒトHGFのアミノ酸534、673および/または692位のアミノ酸が置換されたHGFを用いることができる(特開2004–000236号)。HGF遺伝子の塩基配列は、Accession番号NM_000601の166から2349番目およびNM_001010932の166から2334番目、HGFのアミノ酸配列はAccession番号NP_000592およびNP_001010932にも記載されている。さらに、HGFとして、免疫グロブリン定常領域やフィブロネクチン断片などの所望のポリペプチドが付加された融合蛋白質を用いてもよい(特開2004–269423、国際公開第91/08298号)。

- [0036] 線維芽細胞増殖因子2 (FGF2) は、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) と呼ばれ、線維芽細胞の増殖のみならず、血管内皮細胞、軟骨、骨芽細胞、表皮細胞など様々な細胞の増殖を促進する活性を有する因子として知られている (Abrahamら, EMBO J., 5, 2523–2528, 1986、Pratsら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 1836–1840, 1989)。例えばFGF2遺伝子の塩基配列は、Accession番号NM_002006の69から932番目、FGF2のアミノ酸配列はAccession番号NP_001997にも記載されている。FGF2としては、天然の蛋白質のみならず、組み換えDNA技術により遺伝子工学的に製造されたもの、およびそれらの修飾体であってもよい。例えば国際公開第87/01728、同89/04832、同86/07595、同87/03885、欧州特許出願公開第237966号、同281822号、同326907号、同394951号、同493737号などに記載のものを例示することができる。

[0037] インターフェロン(IFN)であれば、例えばIFN- α は、Grenら(1984)J. Interferon Res. 4(4):609-617、およびWeismannら(1982)Princess Takamatsu Symp. 12:1-22に、IFN- β はDerynck, R. et al., Nature 285, 542-547(1980); Higashi, Y. et al., J. Biol. Chem. 258, 9522-9529(1983); Kuga, T. et al., Nucleic Acids Res. 17, 3291(1989)を参照できる。例えばIFN- α 1遺伝子の塩基配列は、Accession番号NM_024013の68から634番目、IFN- α 1のアミノ酸配列はAccession番号NP_076918にも記載されている。IFN- β 遺伝子の塩基配列は、Accession番号NM_002176の76から636番目、IFN- β のアミノ酸配列はAccession番号NP_002167にも記載されている。IFN- γ 遺伝子の塩基配列は、Accession番号NM_000619の127から624番目、IFN- γ のアミノ酸配列はAccession番号NP_000610にも記載されている。上記のサイトカインには多型およびバリエーションが存在する。野生型と同等の活性を持つものであれば、これらの多型およびバリエーションを適宜使用することができる。本発明においてIFNには、IFN- α 、IFN- β 、およびIFN- γ 等が含まれるが、好ましくはI型IFN(IFN- α および β)である。

[0038] 各種サイトカインおよびその誘導体の生物学的活性は、周知の方法によりアッセイすることができる。例えばHGFであれば、インビトロまたはインビボにおける肝細胞増殖の促進を検出することにより測定できる。具体的には、肝細胞の初代培養に天然または人工のHGFを添加し、細胞のDNA合成の促進を検出することにより肝細胞分裂促進作用を同定することができる。肝細胞のDNA合成は、 $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みによりアッセイが可能である(Nakamura, Biochem. Biophys. Res. Comm. 122, 140-1459, 1984、同, J. Biochem. 94, 1029-1035, 1983)。FGF2であれば、線維芽細胞または血管内皮細胞などに対する増殖促進活性を上記と同様に検出することができる。IFNであれば、例えばvesicular stomatitis virusによる細胞毒性を阻害する活性のアッセイにより、抗ウイルス活性を測定することができる。具体的には、WISH cells(CCL-25; A. T. C. C. (American Type Culture Collection), Manassas, VA, U. S. A.)にvesicular stomatitis-Indiana-virus[VR-1238AF; A. T. C. C.]を接種し、ウイルスによる細胞死を検出し、IFN

による防御を測定する(測定条件は、Knezic, Z. , et al. (1993) Antiviral Res . 25, 215-221に従う)。

- [0039] 本明細書において、「細胞の分化・増殖制御活性」とは、細胞を量的にコントロールし、目的の機能を有する細胞を増加させる活性をいう。

本明細書において、「細胞の機能制御活性」とは、細胞の機能を質的にコントロールし、既存の細胞において目的の機能を向上させる活性をいう。

- [0040] 本明細書において、「免疫抑制に関連する因子」とは、免疫反応を弱める、回避する、あるいは積極的に免疫寛容を導く活性を有するタンパク質、ペプチドをいう。

本明細書において、「マーカー」とは、組織または細胞の免疫組織学的染色または直接または間接免疫蛍光染色に適したタンパク質をコードする遺伝子をいう。好ましくはGFP、Liv2、HNF4、A6、アルブミン、ルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、SEAP、より好ましくはGFP、ルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、さらにより好ましくはGFPである。なお、GFPは、緑色蛍光蛋白質(green fluorescent protein)の略称である。

- [0041] これらのマーカー遺伝子は、形質転換された骨髄関連細胞において発現され、マーカー遺伝子の種類に応じた公知の検出方法によって検出可能である。例えば、GFPは、490nmないし520nmの範囲で蛍光検出することが可能である。よって、直接または間接免疫蛍光染色によって、前記骨髄細胞の組織における局在を蛍光顕微鏡を用いて観察することができる。

- [0042] さらに、GFPの変異体でより強い蛍光を発するEGFP(enhanced green fluorescent protein)、YFP(yellow fluorescent protein)、BFP(blue fluorescent protein)、RFP(red fluorescent protein)(例えば、Clontech社より入手可能)などもマーカーとして使用可能である。

- [0043] 骨髄関連細胞に遺伝子を組み込むことができるベクターとしては、簡単には当該技術分野において入手可能な発現ベクターである。発現ベクターの種類は、骨髄関連細胞において、所望の遺伝子を発現し、所望のタンパク質を生産する機能を有するものであれば特に限定されない。例えば、ウイルスベクター、プラスミドベクター、ファージベクター等が含まれる。ウイルスベクターは、特にアデノウイルスベクター、セン

ダイウイルスベクターを含むマイナス鎖RNAウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、およびレンチウイルスベクターを含むレトロウイルスベクターなどが好ましい。特に好ましくはアデノウイルスベクター、およびセンダイウイルスベクターなどを含むマイナス鎖RNAウイルスベクターである。

[0044] ウイルスベクターを用いた遺伝子導入法および遺伝子発現は、村松、山本編集、「実験医学別冊 新訂 新遺伝子工学ハンドブック」改訂版(羊土社)、1999年、p. 202-215に準じて行うことができる。ウイルスベクターは動物培養細胞における発現効率が高いことで知られている。後述する実施例1に記載したように、骨髓細胞での遺伝子発現は、アデノウイルスベクター、センダイウイルスベクターともに80%以上の細胞で認められた。こうしたウイルスベクターを用いることによって、遺伝子導入した細胞を死滅させることなく、遺伝子発現を行うことができ、該遺伝子の機能を調べることも可能となる。また、組換えウイルスベクターの調製法は極めて非効率であることが知られているが、例えば、COS-TPC法(Miyake, S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 1320-1324(1996))を採用することにより、調製効率を高めることができる。

[0045] さらに例を挙げれば、アデノウイルスベクターの作製は、斎藤らの方法および他(Miyakeら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93巻, 1320-1324, 1996、Kanegaeら, Acta Paediatr. Jpn, 38巻, 182-188, 1996、鐘ヶ江ら, バイオマニュアルシリーズ4-遺伝子導入と発現・解析法, 43-58, 羊土社, 1994、鐘ヶ江ら, 細胞工学, 13巻, 8号, 757-763, 1994)に従って製造することができる。また、例えばレトロウイルスベクターであれば、脇本ら, 蛋白質核酸酵素, 40巻, 2508-2513, 1995、アデノ随伴ウイルスベクターであれば、玉寄ら, 蛋白質核酸酵素, 40巻, 2532-2538, 1995の方法により、ベクターを調製することができる。哺乳動物に遺伝子導入可能なその他のウイルスベクターを製造するための詳細は、組換えワクシニアウイルスを製造する方法としては、特表平6-502069、特公平6-95937、特公平6-71429が知られている。組換えパピローマウイルスを製造する方法としては特公平6-34727、特表平6-505626が知られている。組換えアデノ随伴ウイルスを製造する方法としては、特開平5-308975が知られている。組換えアデノウイルスを製造する方

法としては、特表平6-508039が知られている。マイナス鎖RNAウイルスであれば、国際公開番号97/16539、同97/16538、同00/70055、同00/70070などに記載の方法が知られている。

- [0046] マイナス鎖RNAウイルスとしては、一本鎖ネガティブ鎖[すなわちマイナス鎖]RNAをゲノムに有する一本鎖マイナス鎖RNAウイルス(非分節型(non-segmented)マイナス鎖RNAウイルスとも言う)が特に好ましい。このようなウイルスとしては、パラミクソウイルス(Paramyxoviridae; Paramyxovirus, Morbillivirus, Rubulavirus, およびPneumovirus属等を含む)、ラブドウイルス(Rhabdoviridae; Vesiculovirus, Lyssavirus, およびEphemerovirus属等を含む)、フィロウイルス(Filoviridae)、オルトミクソウイルス(Orthomyxoviridae; Influenza virus A, B, C, およびThogoto-like viruses等を含む)、ブニヤウイルス(Bunyaviridae; Bunyavirus, Hantavirus, Nairovirus, およびPhlebovirus属等を含む)、アレナウイルス(Arenaviridae)などの科に属するウイルスが含まれる。
- [0047] 本発明において用いられるマイナス鎖RNAウイルスは、より好ましくは、パラミクソウイルス亜科(レスピロウイルス属、ルブラウイルス属、およびモルビリウイルス属を含む)に属するウイルスまたはその誘導体であり、より好ましくはレスピロウイルス属(genus Respirovirus) (パラミクソウイルス属(Paramyxovirus)とも言う)に属するウイルスまたはその誘導体である。誘導体には、ウイルスによる遺伝子導入能を損なわないように、ウイルス遺伝子が改変されたウイルス、および化学修飾されたウイルス等が含まれる。本発明を適用可能なレスピロウイルス属ウイルスとしては、例えばヒトパラインフルエンザウイルス1型(HPIV-1)、ヒトパラインフルエンザウイルス3型(HPIV-3)、ウシパラインフルエンザウイルス3型(BPIV-3)、センダイウイルス(Sendai virus; マウスパラインフルエンザウイルス1型とも呼ばれる)、およびサルパラインフルエンザウイルス10型(SPIV-10)などが含まれる。本発明においてパラミクソウイルスは、最も好ましくはセンダイウイルスである。これらのウイルスは、天然株、野生株、変異株、ラボ継代株、および人為的に構築された株などに由来してもよい。
- [0048] また、本発明において用いるマイナス鎖RNAウイルスベクターは、1つまたは複数のエンベロープ構成蛋白質の遺伝子を欠損するものが好ましい。エンベロープ構成

蛋白質とは、ウイルスのエンベロープの成分となるウイルス蛋白質を言い、エンベロープ表面に露出し細胞への接着または感染に機能するスパイク蛋白質およびエンベロープの形成等に機能する裏打ち蛋白質が含まれる。典型的には、エンベロープ構成蛋白質の遺伝子としてはF(フュージョン)、HN(ヘマグルチニン・ノイラミニダーゼ)、およびM(マトリックス)が挙げられ、ウイルス種によってはH(ヘマグルチニン)、M1、およびG等の遺伝子が含まれる。これらのエンベロープ構成蛋白質の遺伝子の1つまたは複数を変異および／または欠失させたウイルスは、感染細胞における感染性ウイルス粒子の形成能が低下するため安全性が高い。また細胞傷害性が有意に低下する。ゲノムにおいて欠損させる遺伝子としては、例えばF遺伝子、HN(またはH)遺伝子、M遺伝子、またはその任意の組み合わせが挙げられる。特に好ましくは、F遺伝子が欠損している。F遺伝子が欠損しているとは、少なくともF遺伝子が欠損しているということであり、さらに他の遺伝子を欠損していてもよい。より好ましくは、少なくともF遺伝子およびHN(またはH)遺伝子が欠損している。さらに好ましくは、F遺伝子、HN(またはH)遺伝子およびM遺伝子が欠損している。

- [0049] より具体的な組み換えマイナス鎖RNAウイルスベクターの再構成は、例えば以下の文献を参照することができる(国際公開番号(WO)97/16539;WO97/16538;WO00/70055;WO00/70070;WO01/18223;WO03/025570;Durbin, A. P. ら, Virology, 1997:235;323-332;Whelan, S. P. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995:92;8388-8392;Schnell, M. J. ら, EMBO J. , 1994:13;4195-4203;Radecke, F. ら, EMBO J. , 1995:14;5773-5784;Lawson, N. D. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:4477-4481;Garcin, D. ら, EMBO J. , 1995:14;6087-6094;Kato, A. ら, Genes Cells. , 1996:1;569-579;Baron, M. D. およびBarrett, T. , J. Virol. 1997:71;1265-1271;Bridgen, A. およびElliott, R. M. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA. , 1996:93;15400-15404;Hasan, M. K. ら, J. Gen. Virol. , 1997:78;2813-2820;Kato, A. ら, EMBO J. , 1997:16;578-587;Yu, D. ら, Genes Cells, 1997:2;457-466;Tokusumi, T. ら, Virus Res. , 2002:86;33-38;Li, H. -O. ら, J. Virol. , 2000:74;6564-6569;Hirata, T. ら, J. Virol. Methods,

2002:104;125-133;Inoue, M. ら, J. Virol. , 2003:77;6419-6429;Inoue, M. ら, J. Gene Med. . 2004;6:1069-1081)。これらの方法により、パラインフルエンザ、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス、麻疹ウイルス、リンダーペストウイルス、センダイウイルスなどを含むマイナス鎖RNAウイルスをDNAから再構成させることができる。

[0050] 組換えウイルスベクターの好ましい態様は、adexHGF (HGF遺伝子を担持したアデノウイルスベクター)、FGF2-SeV/ Δ F (FGF遺伝子を担持し、F遺伝子フラグメントを欠失させたセンダイウイルスベクター)、IFN β -SeV/ Δ F (IFN β 遺伝子を担持し、F遺伝子フラグメントを欠失させたセンダイウイルスベクター)である。より好ましくは、adexHGF、hFGF2-SeV/ Δ F、IFN β -SeV/ Δ Fである。具体的には、後述する実施例2などに記載したように、本発明の形質転換骨髄関連細胞は、adexHGF、hFGF2-SeV/ Δ F、IFN β -SeV/ Δ Fなどを感染させることによって調製することができる。

[0051] 本発明の一態様においては、ウイルスベクターに限定されず、動物細胞に通常使用される組換えベクターを使用することもできる。プラスミド等のベクターに遺伝子を組み込む方法としては、例えば、Sambrook, J. ら, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3rd edition), Cold Spring Harbor Laboratory, 1. 1 (2001)に記載の方法が挙げられる。簡便には、市販のライゲーションキット(例えば、宝酒造製等)を用いることもできる。このようにして得られる組換えベクター(例えば、組換えプラスミド)は、宿主細胞(例えば、大腸菌DH5 α 、DH10BAC、またはXL-1Blue等)に塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法、PEGなどの化学的な処理による方法によって導入し、増幅・精製することができる(Sambrook, J. ら, 前記)。さらに、組換え発現ベクターの構築は、常法に従って行うことができ、例えば、制限酵素処理および連結作業を必要としないGatewayシステム(インビトロジェン社)を用いて行うこともできる。発現ベクターの種類は、特に限定されないが、例えば、哺乳類細胞用発現ベクターとしてはpFLAG-CMV1、pcDNA3. 1、pGreenLanternなどが好ましい。本発明の形質転換骨髄関連細胞は、組換え発現ベクターを骨髄関連細胞に導入することによって得ることができる。

[0052] 本発明の一態様において、維持および／または修復の対象となる組織には、疾患組織が含まれる。ここで、疾患とは、細菌感染、ウイルス感染、アルコール摂取、薬物投与、癌化、遺伝子発現の異常などによって、生体の一部または全部の臓器または組織が正常の機能を維持できなくなった状態、またはこのような状態にある患者をいう。限定されるわけではないが、疾患には、炎症性疾患、肝疾患、免疫性疾患、癌疾患、遺伝子疾患などが含まれる。本発明の一態様において、炎症性疾患には、肝疾患が含まれる。好ましくは、肝障害、肝不全、肝炎、肝硬変、脂肪肝、肝癌、より好ましくは、肝障害、肝不全、肝炎である。すなわち本発明は、骨髓関連細胞による組織の維持および／または修復する機能を補助する機能を有する遺伝子を搭載するベクターを用いた肝疾患治療薬の製造方法、および肝疾患治療薬の製造における、骨髓関連細胞による組織の維持および／または修復する機能を補助する機能を有する遺伝子を搭載するベクターの使用、および該ベクターが導入された骨髓関連細胞の同使用に関する。本発明の形質転換骨髓関連細胞の投与により、肝逸脱酵素であるGOT、GPT、LDHの測定値を減少させ、肝機能を改善することができる。従って本発明は、骨髓関連細胞による組織の維持および／または修復する機能を補助する機能を有する遺伝子を搭載するベクターを用いた、肝機能改善剤の製造方法、および肝機能改善剤の製造における、骨髓関連細胞による組織の維持および／または修復する機能を補助する機能を有する遺伝子を搭載するベクターの使用、および該ベクターが導入された骨髓関連細胞の同使用に関する。ベクターに搭載させる遺伝子としては、特にHGF、FGF2、およびIFN β が挙げられる。

[0053] 具体的には、本発明は以下の発明も含まれる。

[1] HGF、FGF2、またはIFNをコードするベクターを骨髓関連細胞を導入する工程を含む、肝疾患治療薬の製造方法。

[2] ベクターがHGFまたはFGF2をコードする、[1]に記載の方法。

[3] ベクターがIFNをコードする、[1]に記載の方法。

[4] 肝疾患が、肝障害、肝不全、肝硬変、または肝炎である、[2]に記載の方法。

[5] 肝疾患が、肝癌である、[3]に記載の方法。

[6] 該ベクターが、アデノウイルスベクターまたはマイナス鎖RNAウイルスベクターで

ある、〔1〕から〔5〕のいずれかに記載の方法。

〔7〕該ベクターがF遺伝子を欠損するマイナス鎖RNAウイルスベクターである、〔6〕に記載の方法。

〔8〕マイナス鎖RNAウイルスベクターがセンダイウイルスベクターである、〔6〕または〔7〕に記載の方法。

〔9〕上記〔1〕から〔8〕のいずれかの方法により製造された肝疾患治療薬。

〔10〕IFNをコードするベクターが導入された骨髓関連細胞および薬学的に許容される媒体を含む抗癌剤。

〔11〕癌が肝癌である、〔10〕に記載の抗癌剤。

〔12〕該ベクターが、アデノウイルスベクターまたはマイナス鎖RNAウイルスベクターである、〔10〕または〔11〕に記載の抗癌剤。

〔13〕該ベクターがF遺伝子を欠損するマイナス鎖RNAウイルスベクターである、〔12〕に記載の抗癌剤。

〔14〕マイナス鎖RNAウイルスベクターがセンダイウイルスベクターである、〔12〕または〔13〕に記載の抗癌剤。

[0054] 本発明の一態様において、本発明の形質転換骨髓関連細胞の使用により、維持および／または修復される対象は、臓器であってもよい。臓器には、肝臓、腎臓、心臓が例示される。

[0055] 本発明の一態様において、維持および／または修復の対象となる組織には、組織移植後の組織が含まれる。限定されるわけではないが、移植組織には、皮膚組織、各種の臓器（例えば、肝臓、腎臓、心臓）の組織が含まれる。さらに、移植組織は、自己、非自己のいずれの組織であってもよい。また、移植組織は、生体から取り出した組織に限定されず、生体から細胞または組織の一部を取り出し、生体外において培養して増殖させた培養組織、あるいは該細胞または組織を生体適合材料に組み込んだ人工培養組織であってもよい。

[0056] 本明細書において、組織の「維持および／または修復」とは、組織または組織を構成する細胞がその機能を一定に保つこと、疾患によって損なった機能を一定レベルにまで回復すること、あるいは疾患部位の切除後における組織の再構築（再生）をい

う。例えば、本発明の一態様において、肝疾患における肝逸脱酵素であるGOT、GPT、LDHの測定値を減少させることができる。ここで、本発明の形質転換骨髄関連細胞の使用により、「肝逸脱酵素値を下げる」とは、肝疾患における肝逸脱酵素値が、 $1/3$ 以下、好ましくは $1/5$ 以下、より好ましくは $1/10$ 以下、さらに好ましくは $1/20$ 以下、さらにより好ましくは $1/30$ 以下、最も好ましくは正常値まで下がることをいう。後述する実施例2に記載したように、本発明の形質転換骨髄関連細胞は、肝疾患のGOT、GPT、LDHをそれぞれおよそ $1/23$ 、 $1/22$ 、 $1/14$ まで下げることができる。なお、GOTは、グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼの略称であり、GPTは、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼの略称であり、LDHは、乳酸デヒドロゲナーゼの略称である。

[0057] 本発明によれば、本発明の形質転換骨髄関連細胞を安全かつ効果的に投与することができれば、その投与経路は特に限定されない。このような条件が満たされる限り、末梢血管内、皮下、筋肉内、局所、腹腔内、脳室内、髄腔内、胸腔内への投与であつてもよい。好ましくは、末梢血管内、皮下への投与、より好ましくは、末梢血管内への投与である。投与剤形は、当業者であれば、前記投与経路において適切な剤形を選択することができ、特に限定されない。例えば、本発明の形質転換骨髄関連細胞を緩衝溶液などに懸濁した溶液剤形として使用可能である。一般的に、投与時の形質転換骨髄関連細胞の使用濃度は、溶液剤形の場合は、1日あたり細胞密度としては約 1×10^4 cells/mlないし約 1×10^{11} cells/mlであり、投与量は、約1mlないし約1000mlである。また、1日あたりの量を適宜数回に分けて投与することもできる。当業者であれば、投与される疾患の年齢、体重、症状、投与経路、投与機関、治療経過、投与剤形に応じて変化させることはできる。投与の対象となる動物に特に制限はないが、例えば所望の哺乳動物が挙げられ、例えばマウス、ラット、イヌ、ブタ、ネコ、ウシ、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、サルなどの非ヒト哺乳動物およびヒトが含まれる。

[0058] 輸液への血小板の混入による血栓や塞栓を防止するため、抗ヒスタミン剤(hydroxyzine 25mg または chlorpheniramine 5mgなど)または副腎皮質ステロイド(hydrocortisone 100mg)などの前投与を行うことができる。移植に凍結細胞を用いる場合、移植細胞溶液中の赤血球の溶血が問題となる場合には、ハプトグロビン製

剤4,000単位の点滴などで尿細管障害を予防することができる。末梢血幹細胞移植の場合は、2日間に分けて輸注することも好ましい。

- [0059] 本発明によれば、哺乳動物から取り出した骨髄関連細胞に、遺伝子を組み込んだベクターを用いて該遺伝子を導入することを含む、形質転換骨髄関連細胞を調製する方法を提供することができる。本発明の形質転換骨髄関連細胞を調製する方法には、(i)骨髄関連細胞を取り出すこと、(ii)ベクターに遺伝子を組み込むこと、および(iii) (ii)で調製したベクターを(i)の骨髄関連細胞に導入すること、が含まれる。各工程で使用可能な手法は、上述した通りである。但し、骨髄関連細胞の調製や、ベクターの作製は、骨髄関連細胞へのベクターの導入とは独立して行うことができる。
- [0060] 骨髄関連細胞へのベクターの導入は、プラスミドベクター等であれば、例えばリン酸カルシウム法(Graham, F. L. およびVan Der Eb, J. Virology, 1973:52;456; Wigler, M. およびSilverstein, S., Cell. 1977:11;223; Chen, C. およびOkayama, H. Mol. Cell. Biol., 1987:7;2745)、種々のトランスフェクション試薬を用いた方法、あるいは電気穿孔法等を用いることができる。トランスフェクション試薬については、DEAE-デキストラン(Sigma #D-9885 M. W. 5×10^5)、DOTMA(Roche)、Superfect(QIAGEN #301305)、DOTAP、DOPE、DOSPER(Roche #1811169)、TransIT-LT1(Mirus, Product No. MIR2300)などを用いることができる。ウイルスベクターを用いる場合は、適当な生理的水溶液中で骨髄関連細胞をウイルスベクターと接触させることにより導入することができる。ウイルスベクターと骨髄関連細胞との接触は、体内(in vivo)または体外(in vitro またはex vivo)で行うことができ、例えば培養液、生理食塩水、血液、血漿、血清、体液など所望の生理的水溶液中で実施すればよい。
- [0061] ベクターと骨髄関連細胞との接触においては、MOI(多重感染度;細胞1つあたりの感染ウイルス数)は1-500の間にすることが好ましく、より好ましくは2-300、さらに好ましくは3-200、さらに好ましくは5-100、さらに好ましくは7-70である。ベクターを導入した骨髄関連細胞は、薬理的に許容される所望の担体または媒体と組み合わせる移植組成物とすることができる。「薬学的に許容される担体または媒体」とは、生細胞を懸濁できる溶液であれば制限はない。例えばリン酸緩衝生理食塩水(P

BS)、塩化ナトリウム溶液、リンゲル溶液、培養液等が挙げられる。

- [0062] 本発明によれば、本発明の形質転換骨髄関連細胞を調製するための、遺伝子を担持する組換えベクターの使用法を提供することができる。

本発明によれば、本発明の形質転換骨髄関連細胞を生体内に投与することを含む、組織の維持および／または修復する方法を提供することができる。

- [0063] 本発明によれば、本発明の形質転換骨髄関連細胞を用いて疾患を診断する方法を提供することができる。本発明の方法は、マーカー遺伝子を組み込んだベクターが導入された、本発明の形質転換骨髄関連細胞を生体内に投与し、疾患組織における修復過程を観察することによって、行うことができる。

- [0064] 本発明の一態様においては、マーカー遺伝子としてGFPをコードする遺伝子をウイルスベクターに組み込んだadexGFP、GFP-SeV／ ΔF などが使用できる。より具体的には、後述する実施例3に記載したように、ラットを用いた場合には、採取した骨髄細胞にadexGFPまたはGFP-SeV／ ΔF を導入し、形質転換した骨髄細胞をラットの末梢血管に投与する。骨髄細胞の採取についての詳細な手法については、Teraiら(2003)の報告(前述)に従って行うことができる。ラットに投与して所定時間後(例えば、24時間後、48時間後)に、ラットから組織(例えば、肝臓、肝組織)を採取し凍結乾燥後に組織切片を作成する。このような組織の採取、固定法、切片の作製などは、常法に従って行うことができる。組織における修復過程の経過観察は、所定時間後の各組織を、例えば、直接または間接免疫蛍光染色によって、前記骨髄細胞の組織における局在を蛍光顕微鏡を用いて行うことができる。蛍光染色による組織観察は、Teraiら(2003)、Liら(2000)の報告(ともに前述)に記載した手法に準じて行うことができる。当業者であれば、組織観察は、使用するマーカー遺伝子の種類に応じて適切なものを使用可能である。

実施例

- [0065] 以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もともと、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

当業者は、本明細書の記載に基づいて容易に本発明に修飾、変更を加えることができ、それらは本発明の技術的範囲に含まれる。

なお、本明細書において引用された文献は、本明細書の一部として組み込まれる。

[0066] 実施例1 遺伝子発現の評価

骨髄細胞における遺伝子発現を評価するために、GFP遺伝子搭載アデノウイルスベクター(adexGFP)、GFP遺伝子搭載F遺伝子欠失型センダイウイルスベクター(GFP-SeV/ Δ F)を用いて行った。骨髄細胞は、雄ウイスター系ラット(10-12週齢、体重250-300g/匹;日本クレア)の大腿骨から採取した。骨髄細胞の採取は、Teraïらの報告(前述)に記載されている方法に準じて行った。調整した骨髄細胞懸濁液を24ウェルプレート(コーニング)にそれぞれ1mlずつ播種した。直ちに、adexGFPは20MOI、GFP-SeV/ Δ Fは10MOIの濃度で培養した骨髄細胞に感染させた。マグネットスターラーで15分間攪拌し、その後、37℃で30分間培養した。この工程をさらに1回行った。続いて、骨髄細胞をPBSで2回洗浄し、生理食塩水1ml/ウェルを加え、遺伝子導入48時間後に、骨髄細胞を回収し、FACS(ベクトンディッキンソン)にて遺伝子発現を評価した。

[0067] 骨髄細胞での遺伝子発現は、adexGFP、GFP-SeV/ Δ Fともに80%以上の細胞で認められた。また、遺伝子発現強度(mean channel shift)は、adexGFPでは 12.6 ± 0.2 、GFP-SeV/ Δ Fでは 16.6 ± 0.4 であり、センダイウイルスの方が優れていた。なお、対照群の非感染細胞では、 1.9 ± 0.5 であった。

[0068] 実施例2 肝疾患動物モデルにおける肝機能の修復

疾患組織の修復における本発明の形質転換骨髄関連細胞における効果を調べるために、実験動物を用いて検討した。動物は、実施例1と同様の雄ウイスターラットを使用した。肝疾患として急性肝不全モデルは、ラットに四塩化炭素(CCl_4 ;Sigma)を0.4ml/kg/匹で腹腔内注射することによって作成した。骨髄細胞の採取は、Teraïらの報告(前述)に記載されている方法に準じて行った。同系ラットの大腿骨から採取した骨髄細胞は、平衡塩溶液に 1×10^8 cells/mlになるように調整した。該細胞に導入する遺伝子は、HGFまたはhFGF-2をコードする遺伝子であり、それぞれの遺伝子を組込んであるHGF遺伝子搭載アデノウイルスベクター(adaxHGF;理研ジーンバンク、RDB No. 1553)、hFGF-2遺伝子搭載F遺伝子欠失型センダイウイルスベクター(hFGF2-SeV/ Δ F; Li, O. H. et al., J. Virol., 74, 6564-6

569(2000), Masaki, I. et al., Circ. Res., 90, 966-973(2002))を組換えウイルスベクターとして使用した。

[0069] 調整した細胞懸濁液を24ウェルプレート(コーニング)にそれぞれ1mlずつ播種した。直ちに、adexHGFは20MOI、hFGF2-SeV/ Δ Fは10MOIの濃度で培養した骨髓細胞に感染させた。マグネットスターラーで15分間攪拌し、その後、37°Cで30分間培養した。この工程をさらに1回行った。続いて、骨髓細胞をPBSで2回洗浄し、生理食塩水1ml/ウェルを加え、投与のための骨髓細胞の懸濁液として準備した。一方、CCl₄投与4時間後、準備した骨髓細胞をラットの末梢静脈(尾静脈)から1ml(1×10^8 cells/ml)注射し、CCl₄投与24時間後の血清を採取し、肝逸脱酵素(GOT、GPT、LDH)値を測定した。GOTの酵素活性はシカリキッドAST、GPTの酵素活性はシカリキッドALT、LDHの酵素活性はシカリキッドLDHJ(全て、関東化学)を用いて測定した。

[0070] ラット急性肝不全モデルでのCCl₄投与24時間後の肝逸脱酵素(GOT、GPT、LDH)の測定値を表1に示す。正常値は、GOT、GPT、LDHいずれも30IU/l以下である。

[0071] 表1 形質転換骨髓細胞による肝不全モデルの肝逸脱酵素値の改善

	G O T	G P T	L D H
未治療群	3,743±855	2,656±379	8,427±1895
骨髓細胞のみ	755±321	618±284	2,720±630
adexHGF 導入 骨髓細胞	482±163	279±94	1,327±418
HFGF2-SeV/ Δ F 導入骨髓細胞	163±79	119±81	584±117

(単位: IU/l)

[0072] HGFまたはhFGF-2の遺伝子を導入した骨髓細胞を投与することにより、未治療群に比べて、肝逸脱酵素値の顕著な低下が観察された。HGFとhFGF-2とを比較した場合、hFGF-2の方がその効果が大きかった。未治療群と比較して、GOT値は約1/23、GPT値は約1/22、LDH値は約1/14まで減少した。以上の結果は、肝障害が進行している過程で、遺伝子導入骨髓関連細胞を末梢静脈から投与することで肝障害の修復、治療が促進することを示している。

[0073] 実施例3 組織修復の経過観察

急性肝不全モデルのラットの肝組織における修復過程は、GFPなどのマーカー遺伝子導入骨髓細胞を投与することにより検討することができる。adexGFPまたはGFP-SeV/ ΔF を遺伝子導入した骨髓細胞をラットの末梢血管に投与し、所定時間後に、ラットから肝臓を採取し凍結乾燥後に肝組織切片を作成することができる。肝組織における修復過程の経過観察は、所定時間後の各肝組織を、直接または間接免疫蛍光染色によって、前記骨髓細胞の組織における局在を蛍光顕微鏡を用いて行うことができる。蛍光染色による組織観察は、Teraiら(2003)、Liら(2000)の報告(ともに前述)に記載した手法に準じて行うことができる。

[0074] 実施例4 遺伝子導入骨髓細胞による肝癌に対する治療効果

雄ウィスターラット(日本クレア)の生後5週より、1%ジメチルニトロサミン(DMN)を週一回7週間腹腔内注射し、さらにフェノバルビタール入り飼料(中部科学飼料)を12週間毎日給餌することによって肝癌モデルを作製した。実験開始から6ヶ月後に以下の実験に使用した。骨髓細胞移植実験はTeraiらの報告(Terai, S. et al., J. Biochem. 134, 551-558(2003))の方法に準じて行った。骨髓細胞採取は、同ウィスターラットの大腿骨から行い、 1×10^8 cells/mlに調整した。遺伝子導入は、ヒトインターフェロン β (IFN β) 遺伝子搭載F遺伝子欠失型センダイウイルスベクター(hIFN β -SeV/ ΔF :Li, HO. et al., J. Virol. 71, 6564-6569(2000))を用いた。24well plateを用いて、hIFN β -SeV/ ΔF をMOI=10で感染を行った。15分マグネティックスターラーで攪拌、30分インキュベーションを2回行い、細胞をPBSで2回洗浄、生理食塩水1mlを加えて準備した。このようにして準備したhIFN β -SeV/ ΔF によるhIFN β 遺伝子導入骨髓細胞(1×10^8 cells)を末梢静脈(尾静脈)から注射した。骨髓細胞注射1ヶ月後に犠牲死させ、腫瘍数、腫瘍長径を測定した。骨髓注射を行わなかった対照の肝癌モデルにおける腫瘍数、腫瘍長径値と比較した。

[0075] その結果、骨髓細胞注射1ヶ月後の肝癌モデルにおける、腫瘍数(number)/腫瘍径(mm)は、

未治療群(n=5): $11 \pm 2.3 / 2.6 \pm 0.8$

BM+hIFN β -SeV/ ΔF 導入骨髓細胞注入群(n=5): $3.6 \pm 0.5 / 0.7 \pm$

0. 1

であった(平均±S.D.)。以上の結果は、hIFN β -SeV/ Δ FによるhIFN β 遺伝子導入骨髓細胞投与によって、肝癌の進行を抑制すること、あるいは肝癌の修復、治癒に効果があることが示している。

[0076] 実施例5 肝切除モデルにおける遺伝子導入骨髓細胞による治療効果

雄ウィスターラット(10-12週齢, 250-300g: 日本クレア)を用い、70%肝切除を施行し(肝左葉切除)、切除後直ちに遺伝子導入骨髓細胞を注射した。この骨髓細胞移植実験はTeraiらの報告(Terai, S. et al., J. Biochem. 134, 551-558(2003))の方法に準じて行った。骨髓細胞採取は、同ウィスターラットの大腿骨から行い、 1×10^8 cells/mlに調整した。遺伝子導入は、ヒトFGF-2遺伝子搭載F遺伝子欠失型センダイウイルスベクター(hFGF2-SeV/ Δ F: Li, HO. et al., J. Virol. 71, 6564-6569(2000), Masaki, I. et al., Circ. Res. 90(9), 966-973(2002))を用いた。24well plateを用いて、MOI=10で感染を行った。15分マグネティックスターラーで攪拌、30分インキュベーションを2回行い、細胞をPBSで2回洗浄、生理食塩水1mlを加えて準備した。70%肝切除施行(肝左葉切除)後直ちに、準備した骨髓細胞を末梢静脈(尾静脈)から注射し、24時間後の血清を採取、肝逸脱酵素値を測定した。

[0077] その結果、70%肝切除および骨髓細胞注射後24時間後のGOT/GPT/LDHそれぞれの値は、

未治療群(n=5): $1186 \pm 137 / 662 \pm 49 / 3250 \pm 205$

BM+hFGF2-SeV/ Δ F(n=5): $764 \pm 82 / 356 \pm 41 / 1266 \pm 110$

であった(平均±S.D.)。以上の結果は、大量肝切除時の肝組織傷害が進行している過程で、hFGF2-SeV/ Δ FによるhFGF2遺伝子導入骨髓細胞を投与することによって、肝障害の修復、および治癒が可能であることを示している。

産業上の利用可能性

[0078] 本発明により、遺伝子を組み込んだベクターが導入された形質転換骨髓関連細胞を用いることによって、疾患組織の修復を行うことができた。疾患は、炎症疾患に限定されることはなく、免疫疾患、癌疾患、遺伝子疾患などを問わず、本発明の形質転換

骨髓関連細胞が疾患・病態の組織修復に関与する可能性が示された。

請求の範囲

- [1] 遺伝子を組み込んだベクターが導入された形質転換骨髄関連細胞であって、組織の維持および／または修復に関連する前記形質転換骨髄関連細胞。
- [2] 前記遺伝子が、組織の維持および／または修復に直接関与する、又は形質転換された骨髄関連細胞による組織の維持および／または修復する機能を補助する機能を有する遺伝子であるか、あるいは、マーカー遺伝子である、請求項1に記載の形質転換骨髄関連細胞。
- [3] 組織の維持および／または修復に直接関与する、又は形質転換された骨髄関連細胞による組織の維持および／または修復する機能を補助する機能を有する遺伝子が、HGF、FGF、VEGF、PDGF、インターロイキン、GCSF、MCSF、SCF、IFN、Crx、およびOtx2からなる群から選択される細胞の分化・増殖制御活性または細胞の機能制御活性を有するタンパク質若しくはペプチドをコードする遺伝子である、請求項2に記載の形質転換骨髄関連細胞。
- [4] 前記ベクターが、アデノウイルスベクターまたはセンダイウイルスベクターである、請求項1ないし3のいずれか1項に記載の形質転換骨髄関連細胞。
- [5] アデノウイルスベクターがHGF遺伝子を搭載したアデノウイルスベクターである、請求項4記載の形質転換骨髄関連細胞。
- [6] センダイウイルスベクターがFGF2遺伝子を搭載したセンダイウイルスベクターである、請求項4に記載の形質転換骨髄関連細胞。
- [7] センダイウイルスベクターがIFN遺伝子を搭載したセンダイウイルスベクターである、請求項4に記載の形質転換骨髄関連細胞。
- [8] 骨髄関連細胞が、骨髄細胞、骨髄由来細胞である、請求項1ないし7のいずれか1項に記載の形質転換骨髄関連細胞。
- [9] 前記組織が疾患組織である、請求項1ないし8のいずれか1項に記載の形質転換骨髄関連細胞。
- [10] 疾患が肝疾患である、請求項9に記載の形質転換骨髄関連細胞。
- [11] 肝逸脱酵素値を下げる、請求項10に記載の形質転換骨髄関連細胞。
- [12] 疾患が癌である、請求項9に記載の形質転換骨髄関連細胞。

- [13] 癌が肝癌である、請求項12に記載の形質転換骨髄関連細胞。
- [14] 末梢血管に投与するための、請求項1ないし13のいずれか1項に記載の形質転換骨髄関連細胞。
- [15] 哺乳動物から取り出された骨髄関連細胞に、遺伝子を組み込んだベクターを用いて該遺伝子を導入することを含む、形質転換骨髄関連細胞の調製方法。
- [16] 形質転換骨髄関連細胞を調製するための、遺伝子を担持する組換えベクターの使用。
- [17] 請求項1から14のいずれかに記載の形質転換骨髄関連細胞を含む、組織の維持および／または修復のための医薬。
- [18] 請求項10に記載の形質転換骨髄関連細胞を含む肝疾患治療薬。
- [19] 肝疾患が肝障害、肝不全、肝硬変、または肝炎である、請求項18に記載の肝疾患治療薬。
- [20] 肝疾患が肝癌である、請求項18に記載の肝疾患治療薬。
- [21] 遺伝子がHGFまたはFGF2である、請求項18または19に記載の肝疾患治療薬。
- [22] 遺伝子がIFNである、請求項18または20に記載の肝疾患治療薬。
- [23] ベクターが、アデノウイルスベクターまたはマイナス鎖RNAウイルスベクターである、請求項18に記載の肝疾患治療薬。
- [24] ベクターがF遺伝子を欠損するマイナス鎖RNAウイルスベクターである、請求項23に記載の肝疾患治療薬。
- [25] 請求項10に記載の形質転換骨髄関連細胞および薬学的に許容される媒体を含む組成物を調製する工程を含む、肝疾患治療薬の製造方法。
- [26] 肝疾患が肝障害、肝不全、肝硬変、または肝炎である、請求項25に記載の方法。
- [27] 肝疾患が肝癌である、請求項25に記載の方法。
- [28] 遺伝子がHGFまたはFGF2である、請求項25または26に記載の方法。
- [29] 遺伝子がIFNである、請求項25または27に記載の方法。
- [30] ベクターが、アデノウイルスベクターまたはマイナス鎖RNAウイルスベクターである、請求項25に記載の方法。
- [31] ベクターがF遺伝子を欠損するマイナス鎖RNAウイルスベクターである、請求項30

に記載の方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005144

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12N15/09, A61K35/28, 38/00, 48/00, A61P1/16, 29/00, 35/00,
37/02, C12N5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12N15/09, A61K35/28, 38/00, 48/00, A61P1/16, 29/00, 35/00,
37/02, C12N5/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOTECHNOLOGY ABSTRACT (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN),
WPI (DIALOG), JSTplus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	FELDMAN, E. et al., Adenovirus mediated alpha interferon (IFN-alpha) gene transfer into CD34+ cells and CML mononuclear cells, Stem Cells (1997) Vol.15, No.5, pages 386 to 395	1-4, 8-17/ 6-7, 20, 22-27, 29-31
X/Y	JP 09-501837 A (Rhone Poulenc Rorer S.A.), 25 February, 1997 (25.02.97), Full text & WO 95/06120 A1 & FR 2709309 A1 & AU 9475398 A & ZA 9406264 A & NO 9600743 A & EP 719332 A1 & FI 9600855 A & US 6210963 B1 & IL 110754 A & DE 69433921 E & KR 392984 B	1-4, 8-17/ 6-7, 20, 22-27, 29-31



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

05 July, 2005 (05.07.05)

Date of mailing of the international search report

16 August, 2005 (16.08.05)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005144

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	STUDENY, M. et al., Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors, Cancer Res (2002) Vol.62, No.13, pages 3603 to 3608	1-4,8-17/ 6-7,20, 22-27,29-31
X/Y	DUAN, H.F. et al., Treatment of myocardial ischemia with bone marrow-derived mesenchymal stem cells overexpressing hepatocyte growth factor, Mol Ther (2003) Vol.8, No.3, pages 467 to 474	1-5,8-17/ 6-7,23-26, 30-31
X/Y	OHASHI, T. et al., Reduction of lysosomal storage in murine mucopolysaccharidosis type VII by transplantation of normal and genetically modified macrophages, Blood (2000) Vol.95, No.11, pages 3631 to 3633	1-2,8-19, 25-26/4,6-7, 23-26,30-31
Y	WO 2000/070070 A1 (DNAVEC Research Inc.), 23 November, 2000 (23.11.00), Full text & AU 200046146 A & EP 1186667 A1 & KR 2002014786 A & CN 1355851 A	4,6-7,23-24, 30-31
Y	Akihiro IIDA et al., "Sendai Virus no Reverse Genetics o Katsuyo shita Shinki Idenshi Chiryoyo RNA Vector", Protein, nucleic acid and enzyme (2003) Vol.48, No.10, pages 1371 to 1377	4,6-7,23-24, 30-31
A	Keiya OZAWA, "Zoketsuki Shikkan no Idenshi Chiryo", Immunohaematology (1990) Vol.12, No.4, pages 421 to 427	1-31
A	Tamotsu SAGAWA et al., "Shinpo shita Kangan no Soki Hakken to Chiryo, Kangan no Idenshi Chiryo", Rinsho to Kenkyu (2001) Vol.78, No.7, pages 1265 to 1270	1-31
A	Keiya OZAWA, "Idenshi Iryo no Shinpo, Idenshi Chiryo no Genjo to Saikin no Doko", Rinsho Kagaku (2001) Vol.30, No.1, pages 28 to 34	1-31
A	SHAH, R. et al., Stable transfection of rat preporinsulin II gene into rat hematopoietic stem cells via recombinant adeno-associated virus, Life Sci (1999) Vol.65, No.20, pages 2041 to 2047	1-31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005144

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Yasushi NASHII, "Saitaiketsu o Mochiita Ishoku · Saisei Iryo ni Kansuru Kenkyu" (Japan Health Sciences Foundation S), Soyakuto Human Science Kenkyu Juten Kenkyu Hokokusho Heisei 13 Nendo Dai 5 Bun'ya, Kenko Hoji Zoshin · Yobo Iyakuhin no Kaihatsu ni Kansuru Kenkyu (2002) pages 1 to 6	1-31
A	Takashi YOKOO, "Kotsuzui Kaihen ni yoru Chokiteki Idenshi Do'nyu System o Mochiita Jinzo Saiseiho no Kaihatsu", Sankyo Seimei Kagaku Kenkyu Shinko Zaidan Kenkyu Hokokushu (2003) Vol.19, pages 201 to 209	1-31
A	JP 08-508415 A (UNIVERSITY OF PITTSBURGH OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION), 10 September, 1996 (10.09.96), Full text & WO 95/16353 A1 & AU 9515134 A & EP 690673 A1 & US 5766585 A	1-31

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C12N15/09, A61K35/28, 38/00, 48/00, A61P1/16, 29/00, 35/00, 37/02, C12N5/10

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C12N15/09, A61K35/28, 38/00, 48/00, A61P1/16, 29/00, 35/00, 37/02, C12N5/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOTECHNOLOGY ABSTRACT (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), JSTPlus (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	FELDMAN, E., et al., Adenovirus mediated alpha interferon (IFN-alpha) gene transfer into CD34+ cells and CML mononuclear cells, Stem Cells (1997) Vol. 15, No. 5, p. 386-95.	1-4, 8-17/ 6-7, 20, 22-27 , 29-31
X/Y	JP 09-501837 A (ローン・プーラン・ロレ・ソシエテ・アノニム) 1997.02.25, 全文 & WO 95/06120 A1 & FR 2709309 A1 & AU 9475398 A & ZA 9406264 A & NO 9600743 A & EP 719332 A1 & FI 9600855 A & US 6210963 B1 & IL 110754 A & DE 69433921 E & KR 392984 B	1-4, 8-17/ 6-7, 20, 22-27 , 29-31

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05.07.2005

国際調査報告の発送日

16.8.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

左海 匡子

4 N

3 0 3 8

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	STUDENY, M., et al., Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors, Cancer Res (2002) Vol. 62, No. 13, p. 3603-8.	1-4, 8-17/ 6-7, 20, 22-27 , 29-31
X/Y	DUAN, H. F., et al., Treatment of myocardial ischemia with bone marrow-derived mesenchymal stem cells overexpressing hepatocyte growth factor, Mol Ther (2003) Vol. 8, No. 3, p. 467-74.	1-5, 8-17/ 6-7, 23-26, 30 -31
X/Y	OHASHI, T., et al., Reduction of lysosomal storage in murine mucopolysaccharidosis type VII by transplantation of normal and genetically modified macrophages, Blood (2000) Vol. 95, No. 11, p. 3631-3.	1-2, 8-19, 25- 26/4; 6-7, 23- 26, 30-31
Y	WO 2000/070070 A1 (株式会社ディナベック研究所) 2000. 11. 23, 全文 & AU 200046146 A & EP 1186667 A1 & KR 2002014786 A & CN 1355851 A	4, 6-7, 23-24; 30-31
Y	飯田章博ほか, センダイウイルスのリバーシジェネティクスを活用した新規遺伝子治療用RNAベクター 蛋白質核酸酵素 (2003) 第48巻第10号第1371-77頁	4, 6-7, 23-24, 30-31
A	小沢敬也, 造血器疾患の遺伝子治療 Immunohaematology (1990) 第12巻第4号第421-427頁	1-31
A	佐川保ほか, 進歩した肝がんの早期発見と治療 肝癌の遺伝子治療 臨床と研究 (2001) 第78巻第7号第1265-1270頁	1-31
A	小沢敬也, 遺伝子医療の進歩 遺伝子治療の現状と最近の動向 臨床化学 (2001) 第30巻第1号第28-34頁	1-31
A	SHAH, R., et al., Stable transfection of rat preproinsulin II gene into rat hematopoietic stem cells via recombinant adeno-associated virus, Life Sci (1999) Vol. 65, No. 20, p. 2041-7.	1-31

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	梨井康, さい帯血を用いた移植・再生医療に関する研究 (ヒューマンサイエンス振興財団S) 創薬等ヒューマンサイエンス研究重点研究報告書 平成13年度 第5分野 健康保持増進・予防医薬品の開発に関する研究 (2002) 第1-6頁	1-31
A	横尾隆, 骨髄改変による長期的遺伝子導入システムを用いた腎臓再生法の開発 三共生命科学研究振興財団研究報告集 (2003) 第19巻第201-209頁	1-31
A	JP 08-508415 A (ユニバーシティ オブ ピッツバーグ オブ ザ コモンウェルス システム オブ ハイヤー エデュケーション) 1996.09.10, 全文 & WO 95/16353 A1 & AU 9515134 A & EP 690673 A1 & US 5766585 A	1-31